บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียมบางชนิด เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของการผสมข้ามและการผสมตัวเองของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีมูลค่าการขายในตลาดโลกสูงที่สุด และนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย โดยจุดประสงค์ของการศึกษา คือ เพื่อทราบถึงความสามารถในการผสมข้ามและการผสมตัวเองของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียมบางชนิด เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างลูกผสมที่มีลักษณะที่ดีต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการผสมพันธุ์และการติดฝัก ความสมบูรณ์ของเมล็ดของกล้วยไม้ที่ผสมติด และจำนวนโครโมโซมของต้นพ่อ-แม่พันธุ์ที่ใช้ในการผสม การศึกษาดังกล่าวสามารถวิจารณ์ผลได้ดังนี้

การทดลองที่ 1 การผสมพันธุ์และการติดฝัก

จากการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้ซิมบิเดียม 3 หมู่ และกลุ่มลูกผสม พบว่าการผสมข้ามระหว่างหมู่ *Jensoa* × Hybrid ซึ่งประกอบด้วยคู่ผสมระหว่าง *C. sinense* × *C.* Golden Elf และ *C. sinense* × *C.* hybrid (pink flower) สามารถผสมข้ามได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 100.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการผสมข้ามระหว่างหมู่ Hybrid × *Iridorchis* โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 71.43 เปอร์เซ็นต์ และการผสมข้ามระหว่างหมู่ *Iridorchis* × Hybrid มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อยที่สุด คือ 11.54 เปอร์เซ็นต์ โดยหมู่ที่ผสมข้ามไม่ติด คือ *Cymbidium* × *Iridorchis* และ *Cymbidium* × Hybrid ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถเข้ากันได้ โดยจากการศึกษาของ Leonhardt (1950) ได้ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม พบว่าจำนวนโครโมโซมของหมู่ *Cymbidium* คือ *C. aloifolium* และหมู่ *Iridorchis* คือ *C. insigne C. lowianum* และ *C. tracyanum* มีจำนวนโครโมโซม 2n=40 ถึงแม้ว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า *C. aloifolium* ที่อยู่ในหมู่ *Cymbidium* สามารถผสมข้ามกับ *C. sinense* ที่อยู่ในหมู่ *Jensoa* ได้เพียงชนิดเดียว แต่ไม่สามารถผสมข้ามหมู่อื่นได้ เนื่องจากทั้งหมู่ *Cymbidium* และ *Jensoa* สามารถออกดอกได้ที่พื้นราบ และอุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำ เช่นในภาคเหนือของไทยในการออกดอกเช่นเดียวกัน ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ซิมบิเดียมทนร้อน และอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในช่วงถ่ายละอองเกสรหรือช่วงระยะที่ต้นแม่ถือฝักอยู่ เช่น อากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หนาวเย็นหรือร้อนจนเกินไป (ณัฐา, 2548) และในการศึกษาครั้งนี้มีการเก็บเกสรไว้เพื่อใช้ในการผสมเกสร เนื่องจากดอกบานไม่พร้อมกัน โดยหมู่ *Iridorchis* ต้องการอากาศหนาวเย็นในการชักนำให้ออกดอก และเจริญเติบโตได้ดีในที่ระดับความสูง 1,000-1,900 เมตร ซึ่งออกดอกในช่วงเดือนมกราคม-มิถุนายน มีอุณหภูมิเฉลี่ย 17-23 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นแล้วอาจเนื่องมาจากความห่างทางพันธุกรรม ซึ่งความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ คือ คู่ผสมต้องมีความคล้ายคลึงกันทางด้านพันธุกรรมมากที่สุด (อดิศร, 2547) และการคัดเลือกต้นพ่อ-แม่พันธุ์ไม่เหมาะสม และอาจเนื่องมาจากอายุของละอองเกสรเพศผู้และความพร้อมของยอดเกสรเพศเมีย ซึ่งช่วงเวลาในการออกดอกแตกต่างกันในแต่ละชนิดของกล้วยไม้ซิมบิเดียม และความสามารถในการงอกของละอองเกสรเพศผู้ (pollen) ที่สามารถงอกผ่านก้านเกสรเพศเมีย (style) ลงไปได้แตกต่างกันหรือเกิดจากละอองเกสรเพศผู้เกิดปฏิกิริยากับก้านเกสรเพศเมีย โดยที่ pollen tube สร้างเอนไซม์ออกมาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่เซลล์ของก้านเกสรเพศเมียที่สร้างขึ้น ทำให้ pollen tube ชะงักหยุดการเจริญเติบโตได้ ทำให้ไม่เกิดการปฏิสนธิได้ (นพพร, 2543)

และจากการศึกษาการผสมภายในหมู่ พบว่าการผสมภายในหมู่ *Jensoa* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด คือ 100.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นการผสมภายในหมู่ *Iridorchis* โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด คือ 45.21 เปอร์เซ็นต์ และการผสมภายในกลุ่มลูกผสม (Hybrid) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด คือ 25.00 เปอร์เซ็นต์ และหมู่ *Cymbidium* ไม่สามารถผสมตัวเองได้ แต่ในสภาพธรรมชาติ พบว่า *C. aloifolium* มีการติดฝักได้เองตามธรรมชาติ และเกิดจากการช่วยผสมของมดและแมลง สามารถติดฝักได้ดี

เมื่อพิจารณาจากการศึกษาการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม 5 ชนิด และ 2 สายพันธุ์ พบว่าสามารถผสมติดได้ทั้งหมด 28 คู่ผสม จากทั้งหมด 42 คู่ผสม โดยการผสมข้ามระหว่าง *C. insigne* × *C. sinense* *C. sinense* × *C.* Golden Elf *C. sinense* × *C.* hybrid (pink flower) *C.* Golden Elf × *C. lowianum* *C.* Golden Elf × *C. sinense* *C.* hybrid (pink flower) × *C. insigne* และ *C.* hybrid (pink flower) × *C. lowianum* สามารถผสมเข้ากันได้เป็นอย่างดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 100.00 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผสมแบบสลับพ่อ-แม่ พบว่าทุกคู่ที่กล่าวมาข้างต้น สามารถผสมติดได้เป็นอย่างดีเช่นกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 100.00 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นคู่ผสมระหว่าง *C. sinense* × *C. insigne* ไม่สามารถผสมติดได้ ในขณะที่คู่ผสมระหว่าง *C. insigne* × *C. tracyanum* และ *C. tracyanum* × *C. aloifolium* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อยที่สุด คือ 16.67 เปอร์เซ็นต์ โดย Arditti (1984) รายงานว่า *C. aloifolium* สามารถผสมข้ามได้กับ *C. tracyanum, C. insigne* สามารถผสมข้ามได้กับ *C. lowianum* และ *C. tracyanum* *C. lowianum* สามารถผสมข้ามได้กับ *C. insigne* *C. sinense* และ *C. tracyanum* นอกจากนั้นแล้ว *C. sinense* สามารถผสมข้ามได้กับ *C. lowianum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ *C. tracyanum* สามารถผสมข้ามได้กับ *C. aloifolium C. insigne* และ *C. lowianum* เป็นต้น แต่จากการทดลองพบว่า *C. aloifolium* ไม่สามารถผสมข้ามกับ *C. tracyanum* ได้ อาจเนื่องมาจาก *C. aloifolium* เป็นกล้วยไม้ที่เจริญแบบอิงอาศัย และสามารถทนอากาศร้อนได้ดี สามารถออกดอกได้บนพื้นราบ แต่ *C. tracyanum* ต้องการอากาศหนาวเย็นในการออกดอก เช่น บนพื้นที่สูง ที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ และเป็นกล้วยไม้ที่เจริญบนดิน หรืออาจเป็นสาเหตุด้านสภาพแวดล้อมที่ทำให้ไม่สามารถผสมติดได้ อุณหภูมิสูงทำให้การงอกของละอองเกสรเพศผู้ลดลง หรืออาจทำให้ละอองเกสรตายได้ และความเข้มแสงต่ำทำให้ไม่เกิดการผสมเกสร (สมบุญ, 2538) นอกจากนี้อาจเนื่องจากมีความห่างทางพันธุกรรมในทางลักษณะ จึงมีโอกาสผสมติดได้ยาก แต่ถ้าเป็นพันธุ์พืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก มีโอกาสผสมติดได้ง่ายขึ้น จึงทำให้กล้วยไม้ทั้งสองไม่สามารถผสมข้ามได้ ในขณะที่เมื่อใช้ *C. tracyanum* เป็นแม่พันธุ์ พบว่าสามารถผสมข้ามกับ *C. aloifolium* ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 16.67 เปอร์เซ็นต์ อาจเกิดจากความเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมอันเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้พันธุ์นั้นๆ เช่น กล้วยไม้บางพันธุ์ซึ่งใช้เป็นพ่อพันธุ์ได้ แต่ถ้าหากนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์ไม่ถือฝัก (ณัฐา, 2548) และจากการผสมข้ามชนิด พบว่า *C.* Golden Elf ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *C. ensifolium* × *C.* Enid Haupt ซึ่ง *C. ensifolium* ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อความทนร้อน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเนื่องจากมีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางในแถบตอนใต้ของเอเชีย และเอเชียตะวันออก รวมถึงระดับความทนร้อนก็ต่างกัน จึงทำให้ *C.* Golden Elf สามารถผสมข้ามได้กับทุกชนิด

การศึกษาการผสมข้ามชนิดภายในหมู่ *Iridorchis* และกลุ่มลูกผสม พบว่าการผสมข้ามชนิดภายในหมู่ *Iridorchis* ซึ่งประกอบไปด้วย *C. insigne C. lowianum* และ *C. tracyanum* โดยคู่ผสมระหว่าง *C. tracyanum* × *C. insigne* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงที่สุด คือ 100.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นคู่ระหว่าง *C. lowianum* × *C. tracyanum* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด คือ 46.15 เปอร์เซ็นต์ และคู่ผสมระหว่าง *C. lowianum* × *C. insigne* ไม่สามารถผสมข้ามชนิดภายในหมู่ *Iridorchis* ได้ ถึงแม้ว่ากล้วยไม้ทั้งสองชนิดต้องการอากาศหนาวเย็นในการออกดอก และมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ในช่วงถ่ายละอองเกสรหรือช่วงที่ระยะที่ต้นแม่ถือฝักอยู่ เช่น อากาศหนาวเย็นเกินไป (ณัฐา, 2548) สำหรับการผสมข้ามชนิดภายในกลุ่มลูกผสม พบว่าคู่ผสมระหว่าง *C.* Golden Elf × *C.* hybrid (pink flower) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด คือ 50.00 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อสลับโดยใช้ *C.* hybrid (pink flower) เป็นแม่พันธุ์ และ *C.* Golden Elf เป็นพ่อพันธุ์ ไม่สามารถผสมข้ามชนิดภายในกลุ่มลูกผสมได้ อาจเนื่องมาจาก *C.* Golden Elf ซึ่งเป็นลูกผสมโดยมีสายเลือดของ *C. ensifolium* ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความแตกต่างกันทางด้านสภาพแวดล้อมกับ *C.* hybrid (pink flower) ซึ่งเป็นลูกผสมที่ไม่ทราบชื่อ แต่คาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ว่ามี *C. insigne* อยู่ในสายเลือด และต้องการอากาศหนาวเย็นในการออกดอก ไม่สามารถออกดอกได้บนพื้นราบ จึงทำให้ทั้งสองชนิดไม่สามารถผสมข้ามชนิดกันได้ และการศึกษาการผสมตัวเองของกล้วยไม้ซิมบิเดียม พบว่า *C. insigne C. tracyanum C. lowianum C. sinense* และ *C.* Golden Elf สามารถผสมตัวเองได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การผสมติดเป็น 100.00 เปอร์เซ็นต์ แต่ *C. aloifolium* และ *C.* hybrid (pink flower) ไม่สามารถผสมตัวเองได้ แต่พบการผสมตัวเองของ *C. aloifolium* ในสภาพธรรมชาติ และการช่วยผสมของมด และแมลง จึงทำให้ *C. aloifolium* เกิดการผสมตัวเองได้

การทดลองที่ 2 ความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้ที่ผสมติด

การศึกษาความสมบูรณ์ของกล้วยไม้ซิมบิเดียม 3 หมู่ และกลุ่มลูกผสมที่มีการติดฝัก แล้วนำฝักที่ได้จากการผสมไปตรวจความสมบูรณ์ของเมล็ด โดยแบ่งเป็นเมล็ดสมบูรณ์ และเมล็ดลีบ แล้วนับจำนวนเมล็ดในแต่ละชนิด หาค่าเฉลี่ย พบว่าลักษณะของเมล็ดที่พบส่วนใหญ่เป็นเมล็ดสมบูรณ์ โดยคู่ผสมระหว่างหมู่ *Cymbidium* × *Jensoa* คือ คู่ผสมระหว่าง *C. aloifolium* × *C. sinense* มีเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเมล็ดสูงที่สุด โดยมีเมล็ดสมบูรณ์ 88.24 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดลีบ 11.76 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมเดียวกัน และอาจมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม จึงทำให้ได้เมล็ดสมบูรณ์สูง แต่มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักไม่สูงมากเพียง 37.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นการผสมข้ามระหว่างหมู่ *Iridorchis* × *Jensoa* คือ คู่ผสมระหว่าง *C. tracyanum* × *C. sinense* มีเมล็ดสมบูรณ์ 84.28 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดลีบ 15.62 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับคู่ผสมระหว่าง *C. sinense* × *C.* Golden Elf *C. sinense* × *C.* hybrid (pink flower) *C.* Golden Elf × *C. lowianum C.* Golden Elf × *C. tracyanum* และ *C.* Golden Elf × *C. tracyanum* พบเมล็ดลีบมากกว่าเมล็ดสมบูรณ์ จากรายงานของ Kamemoto *et al*. (1999) กล่าวว่าลูกผสมระหว่างหมู่มักมีการเข้าคู่ของโครโมโซมผิดปกติ และมีความสมบูรณ์ลดลง ถ้าเซลล์สืบพันธุ์ที่ทำงานได้ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมก็สามารถเกิดเป็น ทริพลอยด์ได้ ถ้าเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และเพศเมียไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม เมื่อผสมกันแล้วสามารถเกิดเป็น เตตราพลอยด์ ได้ การทำงานของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม เพื่อผลิตลูกผสม ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมลดลงมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อพิจารณาจากการศึกษาความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้ซิมบิเดียมที่ผสมภายในหมู่ *Iridorchis* ที่ประกอบไปด้วย *C. insigne C. lowianum* และ *C. tracyanum* พบว่าคู่ผสมระหว่าง *C. insigne* × *C. lowianum* มีเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเมล็ดสูงที่สุด โดยมีเมล็ดสมบูรณ์ 90.00 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดลีบ 10.00 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การติดฝักเพียง 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Jaquelyn Concert 'Sawang' ซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจาก *D.* Concert กับ *D.* Jaquelyn Thomas ซึ่งต่างก็เป็นลูกผสมระหว่างหมู่ *Ceratobium* กับ *Phalaenanthe* เมื่อพิจารณาลักษณะของกล้วยไม้พันธุ์นี้ พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน กล้วยไม้หวาย *D.* Jaquelyn Concert 'Sawang' จึงสามารถใช้เป็นแม่พันธุ์ได้ดี และให้เมล็ดสมบูรณ์สูง (ศิริพร, 2546) ในขณะที่คู่ผสมระหว่าง *C. insigne* × *C. tracyanum C. tracyanum* × *C. insigne* และ *C. lowianum* × *C. tracyanum* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบมากกว่าเมล็ดสมบูรณ์ และมีเปอร์เซ็นต์การติดฝัก 16.67 100.00 และ 46.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเห็นว่าคู่ผสมระหว่าง *C. tracyanum* × *C. insigne* มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักสูง แต่มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบมากกว่าเมล็ดสมบูรณ์ อาจเป็นผลที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างชนิดที่ใกล้□เคียงกันมาก การเข้าคู่ของโครโมโซมและการแบ่งโครโมโซมเป็นไปได□ตามปกติ ได้ gamete ที่สมบูรณ์ ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ต่างกันได้ (Dobzhansky, 1953)

จากการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้ซิมบิเดียม 5 ชนิด และกลุ่มลูกผสม 2 สายพันธุ์ พบว่าลักษณะของเมล็ดที่พบส่วนใหญ่เป็นเมล็ดสมบูรณ์มากกว่าเมล็ดลีบ ยกเว้นคู่ผสมระหว่าง *C. insigne* × *C. tracyanum C. tracyanum* × *C. insigne C. lowianum* × *C. tracyanum C. sinense* × *C.* Golden Elf *C.* Golden Elf × *C. lowianum* และ *C.* Golden Elf × *C. sinense* ที่พบลักษณะของเมล็ดลีบมากกว่าเมล็ดสมบูรณ์ และจากการศึกษาความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้ซิมบิเดียมที่ผสมตัวเอง พบว่าเมล็ดของกล้วยไม้ซิมบิเดียมที่ผสมตัวเองติดทุกชนิดมีเมล็ดสมบูรณ์มากกว่าเมล็ดลีบ โดยเฉพาะ *C. tracyanum* มีเมล็ดสมบูรณ์สูงที่สุด โดยมีเมล็ดสมบูรณ์ 95.00 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การติดฝัก 100.00 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ□พันธุ□ จึงขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของการเข้าคู่ของโครโมโซมในลูกผสม เปอร์เซ็นต์□ของ fertility ไม□ควรเท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ หรือสูงกว่าของชนิดพ่อ-แม่ เนื่องจากชนิดที่ต่างกันย่อมมีโครโมโซมหรือยีนที่แตกต่างกันบ้าง แม้ใกล้เคียงกันมากเช่นไรก็ตาม ถ□า fertility เป็น 100.00 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมทุกคู□ควรจะเหมือนกันหมด ชนิดทั้งสองก็ควรเป็นชนิดเดียวกันทางด้าน cytology (Dobzhansky, 1953)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม

การศึกษาเทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นพืชที่ใช้ในการผสมครั้งนี้ โดยเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลาที่แตกต่างกันเพื่อหาช่วงเวลาที่มีเซลล์ปลายรากอยู่ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส การหาความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีโครโมโซมหดสั้นและเห็นโครโมโซมชัดเจน ได้ความแม่นยำในการนับจำนวนโครโมโซม หาความยาวนานในการแช่ปลายรากในสารละลายสีที่ใช้ย้อมโครโมโซมเพื่อจะได้โครโมโซมที่ติดสีชัดเจนและสีไม่จางจนเกินไป

3.1 การเก็บตัวอย่างปลายราก

การเก็บตัวอย่างปลายรากพืชทดลองในช่วงเวลา 8:00 น. 9:00 น. 10:00 น. 11:00 น. และ 12:00 น. แล้วนำปลายรากที่เก็บมาในแต่ละกรรมวิธีไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครโมโซม นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่างปลายราก เพื่อมาศึกษาจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันไปตามชนิดของกล้วยไม้ซิมบิเดียมที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ โดย *C. aloifolium C. sinense* และ *C.* Golden Elf ที่เก็บปลายรากเวลา 8:00 น. *C. insigne C. lowianum* และ *C. tracyanum* ที่เก็บปลายรากเวลา 11:00 น. และ *C.* hybrid (pink flower) ที่เก็บปลายรากเวลา 12:00 น. พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวในระยะเมตาเฟสมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของเอื้องใบไผ่ (*Arundina graminifolia* D. Don Hochr.) ที่เก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 8:00-10:00 น. (ทรงชัย, 2551) เอื้องน้ำต้น (*Calanthe cardioglosssa* Schltr.) เก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 8:00 น. (จารุวรรณ, 2549) แต่บางชนิดสามารถเก็บในช่วงเวลา 11:00 น. มีการแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสมากที่สุด เช่น ช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) (จารุภัทร, 2549)

3.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพเซลล์

การหยุดวงชีพเซลล์ทำโดยการเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลาที่เหมาะสมซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ได้จากข้อ 3.1 แล้วนำตัวอย่างปลายรากไปแช่ในสารละลาย PDB และ 8-HQ เก็บที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส นานเป็นช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อปลายรากไปผ่านขั้นตอนต่างๆ ของการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครโมโซม นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่หยุดวงชีพเซลล์ด้วย PDB นาน 96 ชั่วโมง ให้โครโมโซมที่หดสั้น สามารถเห็นรูปร่างของโครโมโซมชัดเจน และสามารถนับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนได้แน่นอน ส่วนการหยุดวงชีพเซลล์นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง ให้โครโมโซมที่ค่อนข้างยาว และยังทับกันอยู่

จากการใช้สารละลาย PDB และ 8-HQ ในการหยุดวงชีพเซลล์ พบว่าการแช่ในสารละลายทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน โดยวิธีการทำ pretreatment เพื่อทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสในระยะเมตาเฟส ซึ่งระยะนี้โครโมโซมมีขนาดสั้นมากที่สุด ทำให้สามารถนับจำนวนและศึกษารูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน ซึ่งสารที่ใช้ทั้ง 2 ชนิด มีผลต่อเซลล์เหมือนกัน คือ ทำให้เส้นใยสปินเดิลของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ (อมรา, 2546) และจากการทดลองของ Felix and Guerra (2000) ศึกษาโครโมโซมจากการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสของเนื้อเยื่อปลายราก โดยการหยุดวงชีพเซลล์ด้วยสารละลาย 8-HQ เข้มข้น 0.002 โมลาร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน และการทดลองของ Luo (2004) ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ 14 ชนิดจากสกุล *Amitosyigma Chusua Galearis Habenaria Hemiphilia Hemipiliopsis Herminium Peristylus* และ *Ponerochis* โดยใช้เทคนิคของการหยุดวงชีพเซลล์ของเนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8-HQ เข้มข้น 0.002 โมลาร์ นาน 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจนเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของจารุวรรณ (2550) ได้ศึกษาการหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB นาน 36 ชั่วโมง โดยเทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อปลายรากเอื้องน้ำต้นทั้ง 2 แหล่ง มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n=44 และทรงชัย (2551) ศึกษาการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของเอื้องใบไผ่ โดยแช่ในสารละลาย PDB นาน 3 ชั่วโมง สามารถนับจำนวนโครโมโซมของเอื้องใบไผ่ คือ 2n=40

3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้อมสีโครโมโซม

การทดลองเพื่อหาระยะความยาวนานของการแช่ปลายรากในสีย้อมโครโมโซม โดยนำปลายรากที่เก็บตามเวลาที่เหมาะสมของกล้วยไม้แต่ละชนิดไปผ่านขั้นตอนการหยุดวงชีพเซลล์นาน 96 ชั่วโมง ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อปลายรากไปย้อมด้วยสี lacto-propionic orcein นาน 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ปลายรากทุกกรรมวิธีให้เซลล์ที่มีโครโมโซมติดสีเข้มสม่ำเสมอและเห็นชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเอื้องใบไผ่ และเอื้องน้ำต้น ที่ย้อมสีนาน 30 นาที (ทรงชัย, 2551; จารุวรรณ, 2550) โครโมโซมสามารถติดสีได้ดี

จากผลการทดลองในข้อ 3.1-3.3 สามารถสรุปเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม คือ *C. aloifolium C. sinense* และ *C.* Golden Elf เก็บปลายรากที่เวลา 8:00 น. *C. insigne C. lowianum* และ *C. tracyanum* เก็บปลายรากที่เวลา 11:00 น. และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C. hybrid (pink flower) เก็บปลายรากที่เวลา 12:00 น. หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB นาน 96 ชั่วโมง และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี lacto-propionic orcein นาน 30 นาที สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ที่เห็นโครโมโซมชัดเจน พบว่า พืชทดลองมีจำนวนโครโมโซม 2n=40 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Leonhardt (1950)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved